分子標誌因子在蔬菜品種改良上之利用

陳榮芳　　　　羅筱鳳

中央研究院植物研究所　　中國文化大學園藝系

關鍵字：同功異構酶、限制內切酶酶譜多形性、聚合酶連鎖反應、逢機擴增多形性DNA、連鎖圖、數量性狀。

摘要

生物技術中應用於作物改良者，分子標誌因子（molecular markers）是較爲實際與典型的例子之一。在蔬菜作物中，番茄分子標誌因子之研究堪稱典範。在可資利用之分子標誌因子來源中，隨著分子生物技術之進步，已由早期利用蛋白質、酵素膠體電泳法，配合酵素活性染色的同功異構酶（isozyme）分析，進而利用DNA限制內切酶酶譜多形性（Restriction fragment length polymorphisms；RFLPs），至新近應用聚合酶連鎖反應（Polymerase chain reaction；PCR）所產生的聚合酶逢機擴增多形性DNA（Random amplified polymorphic DNA；RAPD）爲標誌因子。這三種方法中，同功異構酶之發展最早，在蔬菜作物之報告亦不勝枚舉，其法之優點爲分析方法簡單，而缺點則爲可當分子標誌因子之因子座有限；而RFLP分析法係利用DNA限制內切酶辨識特殊鹽基系列之特性，若不同個體之DNA序列不同時，限制酶切割後所產生片段之大小、數目亦因此而有不同，經與該段序列有某種程度相似性之探針複合（hybridization）檢定，所產生不同之圖譜做爲標誌因子，此方法之優點爲所產生之因子數遍佈整個基因組，缺點爲分析所用之方法較耗人力與時間；目前蔬菜作物除番茄已建立良好之RFLP分子標誌圖譜外，馬鈴薯、萵苣、甜菜、豌豆及一些十字花科蕓苔屬類蔬菜亦已有了報告。而有關利用聚合酶連鎖反應，其逢機擴增DNA片段大小不同爲標誌因子之方法，其優點爲簡單、快速，缺點爲大部分RAPD分子標誌因子爲顯性，無由分辨異型合子，且有關RAPD在作物上利用之報告目前十分有限，在發展上是否有其他受限之處有待進一步之探討。此外分子標誌因子之利用亦已由早期用以篩選一些主效因子，如抗病、抗蟲、雄不稔性等因子之選拔，進一步用來標定數量性狀之選拔。

前言

分子標誌因子是近代生物技術發展下之產物。在傳統的作物育種改良及選種上，最費力、最耗時的工作莫過於眾多雜交後裔其外表型與因子型之篩選了[19]，而一般遺傳標誌因子即利用其與重要農藝性狀間之連鎖關係，提供作爲間接選拔之工具。陳(1987，1988)[1,2]之報

告中即曾闡明理想標誌因子所須具備之特性及一般形態生理標誌因子之缺點，而分子標誌因子之所以被看好，乃因其具備理想標誌因子之一些特性，而少有一般生理、形態標誌因子之缺點。分子標誌因子在作物改良上應用之優點爲 1.其因子型之分析幾乎可在任何生育期，利用全株或部份組織來測定，較不受生育或生理時期及材料之限制，可節省時間與空間，增進育種效率， 2.可供分析之因子座較多，有益於連鎖群各區段標誌因子之釐定， 3.其因子座一般對植物體無致命性， 4.因子大多具有共同顯性之遺傳行爲，方便F_1及F_2子代同型合子與異型合子之分辨， 5.因子間少有上位性(epistasis)或多效性(pleiotropy)之情形。而目前較普遍被利用來分析分子標誌因子之方法包括 1.蛋白質、同功異構酶電泳法(protein and isozyme electrophoresis)[1,35,36]， 2.DNA限制內切酶酶譜多形性分析法(Restriction fragment length polymorphisms ； RFLPs)[1,7,15,33,36,41]及 3.隨意引子聚合酶連鎖反應(Arbitrary primer－polymerase chain reaction)所產生之逢機擴增DNA片段多形性(Random amplified polymorphic DNA ；RAPD)[44-46]等三種。這三種方法中，以蛋白質、同功異構酶電泳法之發展最早[37]，其在蔬菜作物之改良應用上亦早有報告[10,11,17,37]，目前國內試驗、研究單位，如省農試所園藝系[3]、台大、中興、文化大學等亦已有了此方面之研究；而在限制內切酶酶譜多形性(RFLP)之研究上，蔬菜作物則以番茄[7,16,18,30,38,42,43,49]、萵苣[21,22]及一些蕓苔屬[14,34]等之研究較爲普遍，惟國內這方面之報告極少；而隨意引子聚合酶連鎖反應逢機擴增DNA片段多形性(RAPD)之方法則屬這一、二年內新興之方法，本報告即針對這三種方法在分析上之優缺點作比較，並對此類分子標誌因子在作物改良上之應用、RFLP目前在蔬菜作物之相關研究及AP－PCR之RAPD法其發展上之潛力等作綜合介紹。

蛋白質、同功異構酶標誌因子

所謂蛋白質、同功異構酶標誌因子，係利用不同相對因子所控制合成之酶或蛋白質，若具有不同之分子結構、大小與電荷，則在電場上其移動速率即有不同，利用此種酶、蛋白質之特性在膠體模板上電泳分離後，藉酵素活性染色法來區分其多形性(polymorphism)所產生之標誌因子[1]。此類型標誌因子之優點爲： 1.分析方法簡單、易行， 2.可同時分析之樣品數與因子數較多， 3.所需之組織量較少， 4.儀器設備較不昂貴， 5.因子型一般具有共同顯性之遺傳行爲；其缺點爲： 1.具多形性之因子座較爲有限， 2.有些酶之分析不甚穩定、或易受環境因子之影響。此外，同功異構酶標誌因子之分析，在先天上有其受限之處，如：並非每一種蛋白質均可利用此法分析、後轉譯之修蝕亦可造成酶型之不同，DNA上之鹽基序列之改變並不一定均造成蛋白質組成胺基酸或靜電荷之改變[2]，Bailey氏[5](1983)亦曾提及抽取液、電極緩衝液之組成、pH值、酵素活性染色之條件、取樣植株之生理期等均足以影響酶譜之分析，因此，在利用上不可不慎。惟其分析之方法、條件一經建立，在分析方法與步驟上與RFLP及AP－PCR法比較下，堪稱最爲簡單易行，圖一即爲一般同功異講梅分析之流程。

蛋白質或同功異構酶分析步驟流程圖

蛋白質或酵素之抽取

↓

膠體電泳3-9小時

↓

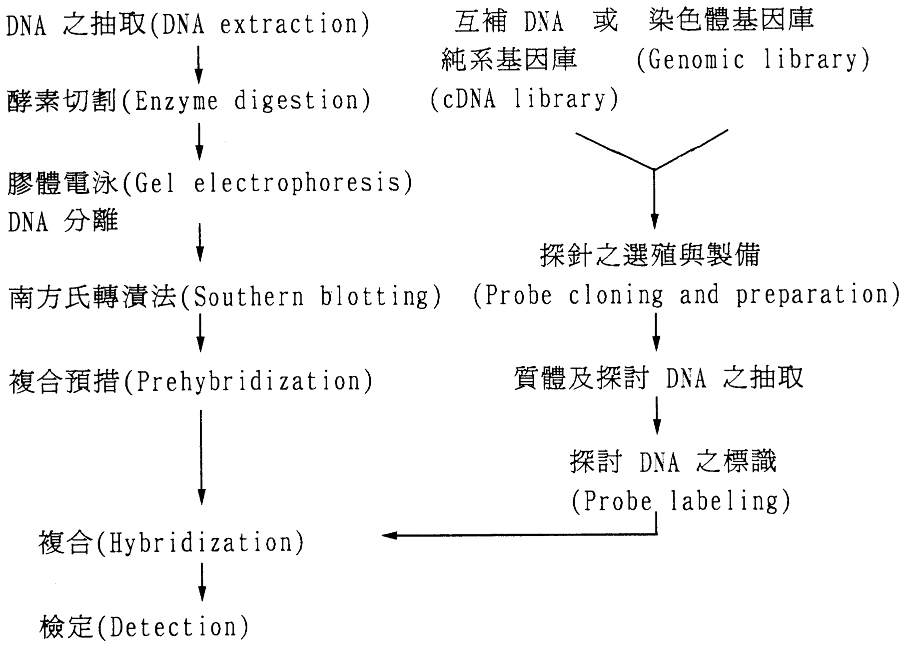
蛋白質或酵素活性染色(1-3小時或過夜)

圖一　蛋白質或同功異構酶分析步聚流程圖

限制內切酶酶譜多形性（RFLPs）

所謂限制內切酶酶譜多形性，係利用限制內切酶（restriction endonuclease）能辨識特殊DNA含氮鹽基序列及切割點之特性，如將兩DNA序列不同之個體，抽取DNA並經限制內切酶切割後，產生片段大小及移動速率不同之分子，利用膠體電泳法將其分離後，轉漬到纖維膜上，以與該欲分析片段有某種程度相似性之DNA片段當探針（probe），利用放射性或非放射性方法標定探針後，複合至纖維膜上，即可檢定出其差異性[1,7]。圖二即爲一般進行RFLP分析之主要方法和步驟之流程，包括DNA之抽取與純化、酵素之切割、DNA之電泳分離、膠體之轉漬（gel blotting）、複合預措（prehybridization）與複合（hybridization）等。而一般探討DNA之來源有二，一爲由互補DNA殖系基因庫（cDNA library）篩選而來，或由染色體組基因庫（genomic library）篩選套數（copy number）較少之DNA片段選殖爲殖系而成。由圖二不難看出欲作RFLP之分析至少有十多個主要步驟，且每一主要步驟下又有細部之分析方法及反應條件。可見在RFLP之分析上，其方法與步驟一般較爲深奧，須有熟悉技術之人員，在分析上才易達到良好的效果。然此類標誌因子之優點爲：1.可直接分析DNA層次上之變異，因子座較爲有意義，2.可供辨識之因子座較多，可滿足各連鎖群、各區段均有標誌因子之需求，3.所用之材料較不受環境因子之影響，4.大部份因子座具共同顯性，對因子型之辨識極爲方便[15,36]。

PFLP 之主要步驟流程圖



圖二 限制內切酶酶譜多形性分析(RFLP)之主要步驟流程圖

隨意引子聚合酶連鎖反應(AP-PCR)所產生之逢機擴增多形性DNA(RAPD)

聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction；PCR)係利用雙股DNA短時間曝露在高溫(90～95℃左右)時，其雙股會分開，產生變性(denature)之情形，當溫度下降至40℃～60℃時，逐漸又煉合 (annealing) 在一起，因此，利用緩衝液中含有適當之引子 (primer)、DNA聚合酶(polymerase)、模板DNA(Template DNA)及合成DNA所須之各式核酸，則在煉合時，引子會與和自己有某種程度相似之模板DNA片段煉合，再經聚合酶之作用延伸 (extension) 新股 DNA [13]。吾人利用重覆DNA變性、煉合及延伸三步驟，即可使目標DNA之片段序列，一次增二倍，如進行30週期的話，則可擴增2^{30}倍(約10^{9}倍)，以往利用此種方法來檢定擴增DNA片段之多形性，一般須對所欲分析DNA片段之首尾序列有所了解以設計適當之引子。惟近來，一連有2～3篇報告提出利用隨意引子(arbitrary primer) 分析逢機擴增片段所產生多形性之情形[44-46]，使利用聚合酶連鎖反應鑑定擴增片段多形性之分析，在沒有欲分析片段之序列資料時亦可進行，大大增加了其應用潛力。圖三即一般PCR反應步驟之流程圖，AP-PCR因所用之引子為逢機任意設計而成，因此在前二週期煉合之溫度較不嚴格，以利初期DNA片段之擴增。利用PCR分析擴增DNA片段之多形性，一般所需之方法與步驟為： 1.逢機任意引子之合成

，2.模板DNA之抽取，3.聚合酶連鎖反應及 4.膠體電泳分離並利用ethidium bromide之螢光染色在UV燈下鑑別。而有關PCR溫度週期之調控，目前也已有了自動化之儀器，在價格上並不十分昂貴，且一般一次分析所需DNA量遠小於RFLP所須之量，但其缺點爲因子之作用大多爲顯性，在利用上所須之標誌因子較多，此外，這種方法目前之有關報告較少，是否有其他缺失有待進一步之評估。

聚合酶連鎖反應(PCR)之步驟流程圖

緩衝液(50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH8.3，1.5mM $MgCl_2$, 0.01% gelatine)

dNTP each 200uM (pH 7.0)

合成引子 (primer) 5-100pmole

鑄模 DNA(template DNA) 7.5ug-30ug ← 鑄模 DNA(template DNA)之抽取

聚合酶 Taq polymerase 2.5u/100ul

礦物油 100ul

↓

PCR cycles

DNA denaturation → Primer annealing → Primer extension → DNA denaturation

DNA denaturation	Primer annealing	Primer extension	Cycles
94℃ (5') →	40℃ (5') →	72℃ (5')	2次
94℃ (1') →	60℃ (1') →	72℃ (2')	30-40次

↓

去礦物油後酒精沈澱，

擴增(amplified)之DNA

↓

膠體電泳分離

ethidium bromide 染色，在 UV 燈下觀察

圖三　聚合酶連鎖反應(PCR)之步驟流程圖

分子標誌因子在育種改良上之應用

分子標誌因子在蔬菜作物改良上之應用，有賴這些標誌因子與重要園藝性狀間之連鎖關係。因此，目前這些標誌因子大多被利用來從事：

一、基因連鎖圖譜之構築[8,9,16,22]：傳統上由於生理、形態標誌因子基因座太少，無足以遍佈整個基因組，今則由於分子標誌因子之助，將有利於完整連鎖基因圖之建立，對日後系統化選種與育種效率之提高大有幫助。

二、遺傳變異之檢定：包括種子純度之檢定、品種之鑑別[33]、突變體之篩選、雜交子代之鑑定以及近緣作物演化關係之探討等[14,26,34,38]。

三、釐定基因位置：分子標誌因子與性狀控制因子間之距離與選種有著密切之關係，一些主效基因如抗病[22]、抗蟲[6,28]、抗病毒[50]、抗眞菌[10,32]、抗殺蟲劑、殺草劑及其他重要農藝性狀如自交不親和、雄不稔性[40]等，若確知其與標誌因子緊密連結的話，將十分有利於標誌因子之選拔。

四、標定數量性狀之基因群[19,20,29,31,39]：以往認爲數量性狀祇能經由試驗設計，利用統計之方法分析估算，然由於RFLP標誌因子之因子數可以遍佈整個基因組，因此利用區間釐定法(interval mapping)即可把數量性狀有關之基因塊標定出來。利用此法標定一些重要數量性狀如品質[29]、產量、雜種優勢以及逆境下之耐性如耐旱、耐寒、耐熱等，將有利於育種改良上之應用。

五、建立近同源系[48]：利用傳統回交法所建立之近同源系其同源程度或回交所須之代數，常因材料之不同而有所差別，而利用遍佈各連鎖群、區間之分子標誌因子，將可建立相似性較高的近同源系，而對於利用近同源系從事基因作用模式之探討，將可大大提高其準確性，且可縮短回交所須之代數。

RFLP在蔬菜作物上之研究現況

目前有關RFLP在蔬菜作物之研究上，仍偏重於種間關係及RFLP標誌因子與性狀基因間關係之探討，已見報告之蔬菜作物包括番茄、蕓苔屬之花椰菜、甘藍和結球白菜、甜菜、胡瓜、萵苣、豌豆及馬鈴薯等（表一），其中以番茄之報告最爲詳盡，相關之報導包括：種族關係與遺傳變異[25]、連鎖圖之構築[8,9,44]、不同探針及限制內切酶對多形性之影響[26]、性狀基因如抗病性[48,49,50]、成熟度[18]、可溶性固型物含量[29,39]、水分利用效率[24]、抗蟲性[28]、抗眞菌[32]及其他有關數量性狀與分子標誌因子間關係之研究等[30,42]；在蕓苔屬，RFLP標誌因子被利用來探討種間與種內多形性及基因組在演化上之關係[13,34]；馬鈴薯目前仍以連鎖圖之構築爲主[9]，最近亦有利用來探討其與抗線蟲因子座之關係[6]；在萵苣上，標誌因子與抗露菌病及其他形態性狀之連鎖關係[22]，及不同來源探針選擇之比較[21]，亦有了較深入之報導；其他如胡瓜[4]、甜菜[27]、豌豆[23]等之報導則較爲零散。

表一　蔬菜作物 RFLP 標誌因子之相關研究

作物	研究項目	參考文獻
蕓苔屬	種間及種內多形性之比較	Figdore et al., 1988
	分類及基因組演化之關係	Song et al., 1990
甜菜	因子型及種別之檢定	Nagamine et al., 1989
胡瓜	老化組織 DNA 變化之檢定	Abeles and Dann, 1990
萵苣	分子標誌因子與抗病性及形態性狀之連鎖關係	Landry et al., 1987b
	探針之選拔及比較	Landry et al., 1987a
豌豆	性狀基因之標定	Lee et al., 1988
馬鈴薯	遺傳連鎖圖之構築	Bonierbale et al., 1988
	抗線虫基因之標定	Barone et al., 1990

一、不同探針及限制內切酶對多形性之影響

如RFLP分析步驟之流程圖所示(圖二)，一般探針(probe)之來源可由互補基因庫(cDNA library)或逢機構築之染色體組基因庫(genomic library)篩選而得，而此二來源不同之探針其診斷多形性之效果是否有區別，Landry氏等(1987)[21]指出，在萵苣利用cDNA殖系可檢測出之多形性約2.5倍於由染色體基因組庫(gDNA library)之殖系，而Miller 和Tanksley氏(1990b)[26]亦指出番茄由互補DNA殖系來之探針亦比由基因組庫來的探針產生之多形性高出25％，表二，即爲不同來源探針其產生多形性頻率之比較，Miller和Tanksley (1990b)並認爲一般由cDNA殖系來之探針其複合之片段，比gDNA殖系之探針複合者爲大，且一般複合片段大者所產生

表二　番茄 RFLP 標誌因子之相關研究

研究項目	參考文獻
種族關係與遺傳變異	Miller and Tanksley, 1990a.
	Helentjaris et al., 1985.
遺傳連鎖圖之構築	Helentjaris et al., 1986.
	Bernatzky and Tanksley, 1986.
不同探針及酵素對多形性之影響	Miller and Tanksley, 1990b.
性狀基因之標定及連鎖	
抗病性	Young et al., 1988.
成熟度	Kinzer et al., 1990.
可溶性固形物含量	Osborn et al., 1987.
	Tanksley and Hewitt, 1988.
水分利用效率	Martin et al., 1989.
抗蟲性	Nienhuis et al., 1987.
抗眞菌性	Sarfatti et al., 1989.
其他數量性狀與分子標誌因子間之關係	Paterson et al., 1988.
	Weller et al., 1988.

多形性之機會亦較大。而一般複合所產生之片段有所謂單套(single copy)及多套(multiple copies)者，通常多套產生多形性較單套多，惟在RFLP 分析上，一般標誌因子以利用單套或套數少者爲多。

而在不同限制內切酶對多形性產生之影響上，則有辨識鹽基序列較長者其產生多形性之頻率較高之趨向，然亦有例外之情形。表三即不同限制內切酶在萵苣中產生多形性之情形，其中Pal I，Msp I及Tag I等可辨識4個鹽基序列，其餘如*Bam* H1，*Dra* I，*Eco* RI，*Eco* RV，*Hind* III等則爲6鹽基序列辨識酶。此外，探針內插DNA片段之大小與多形性產生機會之大小似乎沒有太大的關連。這些報告對進行RFLP多形性之探討，探討來源與內切酶之選擇上可爲參考之依據。

表三　不同來源及種類之探針對檢定 RFLPs 多形性之影響

Class of probes	Clone no.	No. pairwise comparisons	% polymorphism	X^2 independence
Genomic DNA				
Single/low copy	82	1,951	12.5	9.65***
Repetitive	41	1,075	8.7	
cDNA				
Single copy	103	1,684	24.8	13.65***
Multiple copy	53	1,275	30.9	
All gDNA	123	3,026	11.1	25.50***
All cDNA	156	2,959	27.4	
Total	279	5,985	19.2	

(摘自 Landry et al., 1987)

二、種間及種內RFLP多形性情形之比較。

利用RFLP標誌因子從事種間與種內多形性情形之比較，在蕓苔屬(*Brassica*)及茄屬(*Lycopersicon*)均有報導，Figdore氏等(1988)(14)篩選361個套數較少之逢機基因組源之殖系探針，其中包括143個由花椰菜(Early white Cauliflower)，118個從甘藍(Wisconsin Goden Acres Cabbage)及100個由結球白菜(WR 70 days chinese cabbage)之殖系，利用*Eco*RI, *Eco* RV，*Hind* III等三種酵素對蕓苔屬之37個種源搜集系(其中19個爲*B. Campestris*，17個爲*B. deracea*及1個*B. napus*)進行種內及種間多形性之比較，發現不同DNA基因庫來源之探針所產生多形性之頻率亦有不同，而平均而言，在蕓苔屬內，其種間發生多形性之機會約爲95%(表四)，而種內亞種間則有79%，亞種內亦有約70%(表五)之變異性，此種品系內之變異充分說明了大部分蕓苔屬異交授粉之天性。Miller和Tanksley(1990a)(22)在茄屬之種間及種內變異性之研究中，指出自交親和與自交不親和之種間產生多形性之情形差異極大，而一般栽培種番茄之變異性

最少，且品種間亦有所差異，自交不親和之種其產生多形性之頻率遠超自交親和種好幾倍，且不親和種其單一搜集系(accession)內之變異，即勝過自交親和種不同搜集系間之變異。

表四　萵苣不同限制內切酶與不同來源探針驗試出多形性百分比之比較

Restriction endonuclease	Genomic DNA		cDNA		All classes	No. pairwise comparisons
	Single/low copy	Repetitive	Single copy	Multiple copy		
Bam HI	13.5	6.0	22.3	34.4	19.5	728
Dra I	13.4	9.0	15.8	26.7	16.2*	730
Eco RI	16.7	9.2	27.9	37.7	23.1*	750
Eco RV	9.4	8.6	25.8	30.2	19.9	715
Hind III	13.7	14.3	27.6	33.1	21.7	770
Msp I	11.9	9.5	25.9	26.3	18.5	676
Pal I	7.7*	8.7	23.4	22.2*	14.6**	602
Taq I	7.2*	9.7	18.4	31.3	15.5*	491
Xha I	16.6	2.7	37.7	34.9	22.4	523
X^2 (heterogeneity)	16.3*	10.4	23.6**	11.4	28.1**	

(摘自 Landry et al., 1987)

表五　蕓苔屬之種間 DNA 經限制酶 *Eco*RI 切割並與不同探針複合後，多形性發生之頻率

比較別	具變異之比較數	總比較數	多形性之頻率(%)
種間之比較	6332	6671	94.9
B. campestris 對 *B. oleracea*	5493	5759	95.4
ssp. *chinensis* 對 ssp. *italica*	1162	1216	95.6
B. campestris 對 *B. napus*	346	368	94.0
ssp. *pekinensis* 對 ssp. *oleifera*	159	171	93.0
B. oleracea 對 *B. napus*	493	544	90.6
ssp. *italica* 對 ssp. *oleifera*	225	245	91.8

(摘自 Figdore et al., 1988)

三、分子標誌因子與數量性狀間關係之探討

利用分子標誌因子鑑定數量性狀之前提爲須有一完整之遺鎖連鎖圖，上遍佈標誌因子於各連鎖群之各區段。Tanksley 氏等(1988)(30) 即利用由 *Lycopersicon esculentum* CV. VF36 × *L.*

pennellii accession LA716之46個F_2子代個體構築了一個超過300個RFLP標誌因子和20個同功異構酶基因座之連鎖圖譜。此一連鎖圖譜上之標誌因子遍佈番茄之12連鎖群，且平均每5 CM (centi－morgan)(1 CM係指染色體上之距離，其發生重組之機率約爲1%)就有一標誌因子。在番茄，有關數量性狀與分子標誌因子之報導爲可溶性固形物之連鎖關係，而Paterson氏等(1988)[30]亦利用了*L. esculentum* CV. UC 82B X *L. chimielewskii* accession LA1028之雜交組合，選擇了70個標誌因子，其中包括63個RFLP因子，5個同功異構酶及兩個形態生理性狀(有無停心性及成熟度)，用來鳌定如果實鮮重、可溶性固形物及果實pH值等數量性狀之控制因子其所在染色體上之位置，所用之方法爲區間鳌定法(interval mapping)，配合在人類遺傳研究上所發展出來之LOD標示值，來決定該數量性狀所在染色體上之位置。所謂區間鳌定法，即利用類似三點雜交測試法(three point test)，由於每一連鎖群之適當距離均有標誌因子，因此每一數量性狀有關之因子群必座落於二標誌因子間；而LOD測值係一對數值，乃利用直線迴歸模式，假設該數量性狀存在與不存在之情形下估算出來之比值，取其對數，如該測值超過所定之界限值，則該區段因子受數量基因控制之機率就極高，藉此踢除一些不是眞正受數量因子控制之基因塊；至於LOD界限值之訂定，其大小一般受基因組(Genome)之大小及標誌因子之密度來決定。表七即利用一般鳌定法與區間鳌定法在回交選種上的效益比較。而表八即利用分子標誌因子間區鳌定法配合LOD界定值之利用，將番茄一些數量性狀如鮮果重、可溶性固形物含量及果實pH值等，其控制因子數及所在染色體之標定。

表六　蕓苔屬亞種品系DNA經限制酶*Eco* RI切割並與不同探針複合後多形性發生之頻率

比較別	具變異之比較數	總比較數	多形性之頻率(%)
同種內亞種間之比較	2835	3596	78.8
B. campestris 亞種間	1578	1920	82.2
ssp. *chinenesis* 對 ssp. *pekinensis*	967	1192	81.1
B. oleracea 亞種間	1257	1676	75.0
ssp. *italica* 對 ssp. *capitata*	541	716	75.6
同亞種內品系間之比較	2011	2862	70.3
B. campestris 品系間	823	1150	71.6
ssp. *chinensis* 內	454	555	81.8
B. oleracea 品系間	1188	1712	69.4
ssp. *italica* 內	1103	1529	72.1

(摘自 Figdore et al., 1988)

表七 臨近分子標誌因子選拔在回交第一代保持該片段之機率

連鎖關係	保持 X 片段在回交第一代產生之機率
-A --10cM--X ----------	0.90
----------- X --10cM--B -	0.90
-A --10cM--X --10cM--B -	0.99

A，B：分子標誌因子.
X：具經濟價值之基因.
(摘自 Tanksley, 1983)

表八 利用 RFLP 連鎖圖鑑定出番茄數量性狀之控制因子數及其所在連鎖群統計表

性 狀	因子數	連 鎖 群 別
鮮果重	6	1, 4, 6, 7, 9 和 11
可溶性固型物含量	4	3, 4, 6 和 7
果實酸鹼値	5	3, 6, 7, 8 和 10

節錄自 Paterson et al., (1988)

此外，Lander和Bostein(1989)[20]更對利用標誌因子與數量性狀間關係之探討作更詳盡之理論說明，重點包括了 1.利用Sewall wright(1968)[47]所定義之有效因子數(k)來鑑定雜交族群是否適宜用來標定數量性狀，2.利用間區鑑定法配合LOD指數精確地估算及標定數量性狀之影響其數學模式之介紹，3.闡明選擇性因子型之分析，以減低所需分析個體數之立論根據。而有關上述LOD測値之估算法及因子標定之軟體亦已由Lander氏等設計完成，名爲MAPMAKER，該軟體已由國科會補助台灣大學農藝系生物統計研究室申購，當可提供使用。

四、不同雜交分離族群對數量性狀分析之影響

數量性狀確可利用分子標誌因子來標定，而有關數量性狀控制因子在利用標誌因子選拔導入後，其在不同育種族群之選拔效果如何則少有報導。Tanksley和Hewitt(1988)[39] 爲確定分子標誌因子之利用對番茄可溶性固形物之選拔與應用之可靠性，以一具有導入野生種控制該因子之育種品系－LA1563與三番茄品種－UC82B，7879和78W29雜交來分析導入片段對可溶性固形物、果實pH、果實鮮重與產量等方面之影響，在此報告中，計利用了已知連鎖群及相對距離之132個分子標誌因子(其中125個爲RFLP因子座，7個爲異構酶因子座)，分析該品系由 *L. chmielewskii* 導入三片段之影響，結果顯示導入三片段中有二片段與可溶性固形物含

量有關係，但其影響則依所雜交親本之遺傳背景而定。表九即為番茄不同雜交後代族群，其標誌因子對可溶性固形物含量之顯著性分析，顯示因子之作用因不同之遺傳背景而有不同之反應。此外，這兩片段亦被發現與有害性狀，如增加果實之pH值、低產及果實小等不良性狀有關。

由上述不難發現，RFLP標誌因子目前在蔬菜作物之研究上，仍偏重於一些基礎之研究如連鎖關係之建立、標定性狀基因、種緣關係之探討等，而實際應用之例子仍少。

表九　不同因子型對平均可溶性固形物含量在不同F_2分離族群之顯著性分析

F2族群	LA 1563 X 78W29					LA 1563 X 7879					LA 1563 X UC82B				
	因子型				顯	因子型				顯	因子型				顯
因子座				F	著				F	著				F	著
	e/e	e/c	c/c	值	性	e/e	e/c	c/c	值	性	e/e	e/c	c/c	值	性
Aco2	5.55	5.67	5.60	0.49	0.61	6.18	6.53	6.50	4.84	0.01	5.63	5.76	5.44	3.14	0.04
	(60)	(111)	(41)			(64)	(98)	(61)			(71)	(93)	(45)		
Cab4	5.57	5.68	5.67	0.20	0.30	6.21	6.42	6.52	1.93	0.15	5.55	5.82	5.38	4.76	0.01
	(47)	(79)	(27)			(41)	(55)	(39)			(49)	(65)	(38)		
CD56	5.40	5.71	5.75	2.55	0.08	6.26	6.50	6.38	1.49	0.23	5.57	5.72	5.73	0.68	0.51
	(39)	(75)	(48)			(42)	(75)	(40)			(45)	(65)	(41)		
TG13A	5.76	5.60	5.63	0.57	0.57	6.35	6.57	6.32	1.66	0.19	5.62	5.68	5.57	0.24	0.78
	(43)	(74)	(38)			(33)	(62)	(26)			(35)	(72)	(34)		

註：e/e=esculentum 同型結合；e/c=異型結合；c/c=chmielewskii 同型結合·
括弧內為觀測個體數
[摘自 Tanksley and Hewitt (1988)]

利用聚合酶連鎖反應(PCR)所衍生之多形性標誌因子在作物研究上之現況與展望

有關利用聚合酶連鎖反應所產生之標誌因子在作物上之研究近一、二年才有報告，D'Ovidio氏等(1990)[12]首先利用一gamma-gliadin基因之終端序列為引子，利用聚合酶連鎖反應之方法，鑑定出小麥種間與種內之多形性，並認為此方法比RFLP更為簡單且有效，惟利用此型之分析須有所欲分析基因或DNA片段之頭尾序列資料來設計引子，因此在所能分析之標誌因子上造成限制。然Welsh與McClelland(1990)[44]即提出利用任意設計之引子(arbitrary primer)作聚合酶連鎖反應可在水稻三品種間分出變異，而Williams氏等(1990)[46]也幾乎在同時亦提出類似方法在大豆(*Glycine max* L. Merr.)及其近緣種*G. soja*間和兩玉米品系間之分析

，並証實該方法確可用來檢定變異。Williams氏等並利用大豆之雜交後代族群進行該類標誌因子之遺傳分析，且比較了不同引子長度、其內GC鹽基所占比率對多形性產生之影響。在玉米，34個測試之引子，幾乎每一引子均可偵測到多形性，而大豆則在45測試引子中，平均每0.5個引子即可偵測到變異。此AP-PCR所衍生之逢機擴增多形性D NA分析法之優點即在操作上極爲簡單、一次分析所須DNA之量極少，且不需對欲分析片段DNA 之頭尾序列作分析來設計引子。因此，未來利用此一方法所產生之標誌因子對輔助育種改良方面之工作將大有幫助才是，惟此方法因係新近才被提出，且所利用分析之材料有限，加上Williams氏等[46]利用大豆雜交後裔遺傳分析檢定之結果，發現此類AP-PCR所產生之標誌因子多爲顯性，在利用上須分析二倍以上之標識因子座。此外，一般PCR操作上所用之器具須極爲小心，避免污染，至於其他穩定性方面之評估則有待更多之研究報告來証實。相信以其操作上之簡單易學與原理上之容易易懂，在未來分子標識因子之發展上當可占一席之地。

結　論

分子標識因子無疑地可用於輔助傳統育種改良之工作，增進選種效率，然其應用之前提爲確認園藝性狀與分子標誌因子間之連鎖關係，甚或建立完整且遍佈整個染色體組之連鎖圖譜，而在分析方法上亦須力求簡單、穩定與經濟，才能利用於龐大數目之雜交後裔選拔工作上，目前可資利用之三種方法：同功異構酶電泳法，限制內切酶酶譜多形性分析及利用隨意引子聚合酶連鎖反應所衍生之逢機擴增多形性DNA之方法等均各有優缺點，寄望隨著科技之進步，這些問題均能順利解決，而有關標誌因子與數量性狀因子間之關係與所利用族群遺傳背景反應之考量不可不慎，在連鎖關係之探討上當力求有一共同之參考親本，如此對於基因標定位置之差異才不致造成太大之困惑。

參考文獻

1.陳榮芳 1987 生化遺傳標識因子在作物改良上之應用 科學發展月刊15:487-494

2.陳榮芳 1988 蛋白質，同功異構酶與植物遺傳標識因子 植物分子生物學慶祝中央研究院六十週年院慶研討會論文集 PP.93-102.

3.陳福旗、蕭吉雄、張有明和李弘文 1990 甜瓜品種間同功異構酶變異性之研究 I.四個甜瓜品種(PMR、西施、黃金、新玉)間peroxidase及shikimate dehydrogenase 變異性及其在F_1純度鑑定之利用 中華農業研究 39(3)：182-189.

4.Abeles, F. B. and L. J. Dunn. 1990. Restriction fragment length polymorphism anslysis of DNA from senescing cotyledon tissue. Plant Science 79:13-17.

5.Bailey, D. C. 1983. Isozymic variation and plant breeder's right. In: (Tanksley, S. D. and T. J. Orton eds.) Isozymes in plant genetics and breeding. Part A. pp. 425-440. Elsevier Sci. Publ.

Amsterdam.

6. Barone, A., E. Ritter, U. Schachtschabel, T. Debener, F. Salamini, and C. Gebhardt. 1990. Localization by restriction fragment length polymorphism mapping in potato of a major dominant gene conferring resistance to the potato cyst nematode Globodera rostochiensis. Mol. Gen. Genet. 224:177-182.

7. Beckmann, J. S. and M. Soller. 1983. Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement : methodologies, mapping and costs. Theor. Appl. Genet. 67:35-43.

8. Bernatzky, R. and S. D. Tanksley. 1986. Toward a saturated linkage map in tomato based on isozymes and random cDNA sequences. Genetics 112:887-898.

9. Bonierbale, M. W., R. L. Plaisted and S.D. Tanksley. 1988. RFLP maps based on a common set of clones reveal modes of chromosomal evolution in potato and tomato. Genetics 120:1095-1103.

10. Bournival, B. L., J. W. Scott and C. E. Vallejos. 1989. An isozyme marker for resistance to race 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato. Theor. Appl. Genet. 78:489-494.

11. Colby, L. W. and L. C. Peirce. 1988. Using an isozyme marker to identify doubled haploids from anther culture of asparagus. HortScience 23(4):761-763.

12. D'Ovidio, R., O. A Tanzarella and E. Porceddu. 1990. Rapid and efficient detection of genetic polymorphism in wheat through ampilification by polymerase chain reaction. Plant Molecular Biology 15:169-171.

13. Erlich, H. A. 1989. PCR Technology : Principles and applications for DNA amplification. Stockton Press, New York.

14. Figdore, S. S., W. C. Kennard, K. M. Song, M. K. Slocum and T. C. Osborn. 1988. Assessment of the degree of restriction fragment length polymorphism in *Brassica*. Theor. Appl. Genet. 75:833-840

15. Helentjaris, T., G. King, M. Slocum, C. Siedenstrang and S. Wegman. 1985. Restriction fragment polymorphism as probes for plant diversity and their development as tools for applied plant breeding. Plant Molecure Biology 5:109-118.

16. Helentjaris, T., M. Slocum, S. Wright, A. Schaefer and J. Nienhuis. 1986. Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. Theor. Appl. Genet. 72:761-769.

17. Kesseli, R. V. and R. W. Michelmore. 1986. Genetic variation and phylogenies detected from isozyme marker in species of *Lactuca*. J. Heredity 77:324-331.

18. Kinzer, S. M., S. J. Schwager and M. A. Mutschler. 1990. Mapping of ripening-related or -specific cDNA clones of tomato (*Lycopersicon esculentum*). Theor. Appl. Genet. 79:489-496.

19. Lande, R. and R. Thompson. 1990. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. Genetics 124: 743-756.

20. Lander, E. S. and D. Botstein. 1989 Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits

using RFLP linkage maps. Genetics 121:185--199.

21.Landry, B. S., R. Kesslei, H. Leung, and R. W. Michelmore. 1987a. Comparison of restriction endonucleases and sources of probes for their efficiency in detecting restriction fragment length polymorphisms in lettuce (*Lactuca sativa* L.). Theor. Appl. Genet. 74:646-653

22.Landry, B. S., R. V. Kesseli, B. Farrara, and R. W. Michelmore. 1987b. A genetic map of lettuce (*Lactuca sativa* L.)with restriction fragment length polymorphism, isozyme, disease resistance and morphological markers. Genetics 116:331-337.

23.Lee, D., L. Turner, D. R. Davies and T. H. Ellis. 1988. An RFLP marker for *rb* in pea. Theor. Appl. Genet. 75:362-365.

24. Martin, B., J. Nienhuis, G. King, and A. Schaefer. 1989. Restriction fragment length polymorphisms associated with water use efficiency in tomato. Science 243:1725-1729.

25.Miller, J. C. and S. D. Tanksley. 1990a. RFLP anylsis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon.* Theor. Appl. Genet. 80:437-448.

26.Miller, J. C. and S. D. Tanksley. 1990b. Effect of different restriction enzymes, and probe length on detecting restriction fragment length polymorphism in tomato. Theor. Appl. Genet. 80: 385-389.

27.Nagamine, T., G. A. Todd, K. P. McCann, H. J. Newbury and B. V. FordLloyd. 1989. Use of restriction fragment length polymorphism to fingerprint beets at the genotype and species levels. Theor . Appl. Genet. 78:847-851.

28.Nienhuis, J., T. Helentjaris, M. Slocum, B. Ruggero, and A. Schaefer. 1987. Restriction fragment length polymorphism analysis of loci associated with insect resistance in tomato. Crop Sci. 27: 797-803.

29.Osborn, T. C., D. C. Alexander and J. F. Fobes. 1987. Identification of restriction fragment length polymorphisms linked to genes controlling soluble solids content in tomato fruit. Theor. Appl. Genet. 73:350-356.

30.Paterson, A. H., E. S. Lander, J. D. Hewitt, S. Peterson, S. E. Lincoln, and S. D. Tanksley. 1988. Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. Nature 335:721-726.

31.Ratner, M. 1990. Identifying quantitative traits in plants. Bio/ technology 8:401-403.

32.Sarfatti, M. J. Katan, R. Fluhr, and D. Zamir. 1989. An RFLP marker in tomato linked to the *Fusarium oxysporum* resistance gene *I2.* Theor. Appl. Genet. 78:755-759.

33.Soller, M. and J. S. Beckmann. 1983. Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement. Theor. Appl. Genet 67:25-33.

34.Song, K., T. C. Osborn and P. H. Williams. 1990. *Brassica* taxonomy based on nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) 3. Genome relationships in Brassica and related genera and the origin of *B. oleraceae* and *B. rapa* (syn. *campestris*). Theor. Appl. Genet. 79:497

-506.

35.Tanksley, S. D. and C. M. Rick. 1980. Isozymic gene linkage map of the tomato : Applications in genetics and breeding. Theor. Appl. Genet. 57:161-170

36.Tanksley, S. D. 1983. Molecular markers in plant breeding. Plant Molecular Biology Reporter 1(1):3-8.

37.Tanksley, S. D., and T. J. Orton. 1983. Isozymes in plant genetics and breeding. Part A and B. Elsevier Sci. Publ. Amsterdam.

38.Tanksley, S. D. 1987. Organization of the nuclear genome in tomato and related diploid species . Am. Nat. 130 S46-S56.

39.Tanksley, S. D. and J. Hewitt. 1988. Use of molecular markers in breeding for soluble solids content in tomato-a re-examination. Theor. Appl. Genet. 75:811-823.

40.Tanksley, S. D. and D. Zamir. 1988. Double tagging of a male sterile gene in tomatio using a morphological and enzymatic marker gene. HortScience 23(2):387-388.

41.Tanksley, S. D., N. D. Young, A. H. Paterson, and M.W. Bonierbale. 1989. RFLP mapping in plant breeding : new tools for an old science. Bio/technology 7:257-264.

42.Weller, J. I. 1987. Mapping and analysis of quantitative trait loci in *Lycopersicon* (tomato) with the aid of genetic markers using approximate maximum likelihood methods. Heredity 59:413-421.

43. Weller, J. I., M. Soller and T. Brody. 1988. Linkage analysis of quantitative traits in an interspecific cross of tomato (*Lycopersicon esculentum* X *Lycopersicon pimpinellifolium*) by means of genetic markers. Genetics 118:329-339.

44.Welsh, J. And M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Research 18:7213-7218.

45.Welsh, J., C. Petersen and M. McClelland. 1991. Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in the mouse: application to strain identification and genetic mapping. Nucleic Acids Research 19(2):303-307.

46.Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, and V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18:6531- 6535.

47.Wright, S. 1968. Evolution and genetics of populations, Vol. 1. Genetics and biometric foundations. Univ. Chicago Press, Chicago.

48.Young, N. D., D. Zamir, M. W. Martin, and S. D. Tanksley. 1988. Use of isogenic lines and simultaneous probing to identify DNA markers tightly linked to the Tm-2a gene in tomato. Genetics 120: 579-585.

49.Young, N. D. and S. D. Tankley. 1989. Restriction fragment length polymorphism maps and the concept of graphical genotypes. Theor. Appl. Genet. 77: 95-101.

50.Young, N. D. and S. D. Tankley. 1989. RFLP analysis of the size of chromosomal segments retained around the Tm-2 locus of tomato during backcross breeding. Theor. Appl. Genet. 77: 353-359.

UTILIZATION OF MOLECULAR MARKERS IN VEGETABLE CROP IMPROVEMENT

Long-Fang O. Chen
Institute of Botany, Academia Sinica, Nangkang

Hsiao-Feng Lo
Department of Horticulture, Chinese Culture University

Key words : Isozyme, Restriction fragment length polymorphism, Arbitrary-primer, Polymerase chain reaction, Random amplified polymorphic DNA, Quantitative trait, linkage map.

Summary

The utilization of molecular markers for crop improvement is believed to be one of the benefits from biotechnology. Presently, at least three types of molecular markers such as isozyme, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) and RAPD (Random Amplified ploymorphic DNA) derived from AP-PCR (Arbitrary Primer Polymerase Chain Reaction) are available. Among these, isozyme markers were studied the earliest and a lot of research has been conducted. The advantages of isozyme as molecular marker are its simplicity and ease for analysis. However, the limitation on the number of polymorphic loci is the major drawback in its application. RFLP markers analyzed on the DNA level are believed to be very promising because the markers obtained can be saturated all over the linkage map. Nevertheless, the profoundity and complexity of its methodologies have slowed down its utilization. Among the vegetable crop species, RFLP markers and linkage map have been well established in tomato. Other crops such as potato, lettuce, sugar beet, pea and Brassica species also have several studies on the RFLP markers. RAPD derived from AP-PCR was most recently reported. The advantages of RAPD markers are its rapidity and efficiency during the analyzing processes. However, the predominance with dominant gene action on RAPD markers will

require twice as many markers as those of codominant markers to distinguish a heterozygote. Since only very limited studies are avaliable now on RAPD in crop species, whether there is any other limitation requires further investigation. Furthermore, gene mapping is no longer limited to those of major qualitative genes such as disease, insect resistance, and male sterility, etc. Selection for quantitative traits have become possible through the aid of molecular markers.